

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

両生類生殖腺の雌化遺伝子 *CYP19* の
発現機構に関する研究

Promotion of *CYP19* expression during feminization of
indifferent gonads in the frog *Rana rugosa*

申 請 者

大島	裕希
Yuki	Oshima

生命理工学専攻 分子生殖生物学研究

2007 年 12 月

脊椎動物は多くの場合、受精時にその染色体の組み合わせにより遺伝的に性が決定される。その後、その性に依存して、性分化関連遺伝子群が働き、未分化生殖腺を精巢または卵巢へと分化させる。この過程に関する研究は、これまでに主に哺乳類・鳥類・魚類を中心としてなされており、関連する遺伝子が多数同定されてきた。しかしながら、両生類におけるこの分野に関する報告は多くなく、解析も不十分である。本研究は両生類ツチガエル(*Rana rugosa*)を用い、特に卵巢分化機構に注目して研究を行った。卵巢分化にはエストラジオールが重要であることが知られている。エストラジオールをテストステロンから合成する反応を触媒する酵素遺伝子が *CYP19* である。卵巢分化はこの遺伝子の発現調節が重要であると考えられているため、本研究はこの遺伝子の転写調節機構を明らかにすることを目的とした。

第1章では、性決定・性分化機構について、哺乳類・鳥類・魚類を中心に得られている研究成果をもとに、卵巢分化過程における *CYP19* の働きと、その転写調節に関わると推測される遺伝子として *SF-1*, *FoxL2*, *Sox3* について概説する。さらに、卵巢分化研究における本研究の位置づけを示し、目的と意義について述べている。また、本研究の実験動物であるツチガエルについて、その実験動物としての特徴と雌雄判定法、発生段階分期法について説明している。

第2章では、卵巢分化過程に関与していると考えられる遺伝子の発現解析について示している。ツチガエルにおいて *FoxL2* cDNA 配列は得られていなかったため、最初にこの遺伝子の単離を行なった。この結果、1587 bp のツチガエル *FoxL2* cDNA 配列を決定し、この配列から 302 残基のアミノ酸配列が推定された。次に、これらの遺伝子に特異的なプライマーを作製し、成体各組織における発現を調べた。その結果、3つの遺伝子は卵巢で強く発現していることが分かった。さらに、これらの遺伝子の発生過程における発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。*SF-1* は卵巢分化の開始時期 st.25~Ⅲにおいて、雌雄差は見られなかったが、*CYP19*, *FoxL2*, *Sox3* については生殖腺の形態的分化の起こる前の時期 st.25 からすべての段階で雌生殖腺に強い発現を示すことが明らかとなった。さらに *in situ* hybridization 法により、*CYP19* と *Sox3* について、st.I の生殖腺で発現解析を行ない、共に雌生殖腺の体細胞に見られた。リアルタイム RT-PCR 法により、*FoxL2* 及び *Sox3* が *CYP19* と同様に卵巢分化に先立って雌生殖腺において強い発現が見られ、特に *Sox3* については *in situ* hybridization 法により、st.I 雌生殖腺の体細胞において *CYP19* と共発現をしていた。このことから、*Sox3* と *CYP19* の相互作用が期待された。

第3章はツチガエルゲノム DNA ライブラリーの作製と *CYP19* 遺伝子のスクリーニングについて述べている。*CYP19* の転写調節機構を解析するにあたり、そのプロモータ領域の単離は不可欠であるため、ゲノム DNA ライブラリーの構築を行なった。ゲノム DNA は ZZ 型成体オスより抽出し、約 40 kbp に断片化して精製し、ゲノムライブラリーの作製に用いた。ライブラリーは 192 本のグリセロールストックとして保存しており、このライブラリーには理論上、ツチガエルゲノムの 99% が網羅されている。

と推測される。次に、作製したライブラリーを用いて *CYP19* 遺伝子のスクリーニングを試みた。手法としては、*CYP19* 特異的プライマーを用いたコロニーPCR 法による段階的スクリーニングを行ない、最終的に *CYP19* 標的配列を含むゲノム DNA クローンを得ることに成功した。得られたクローンは約 40 kbp のゲノム DNA 断片を含み、塩基配列を解析したところ、*CYP19* の翻訳開始点を含む第 2 エクソン及びその下流の第 3 エクソンが含まれていることが確認された。ヒトおよびマウスを用いた研究により、*CYP19* には組織特異的バリエーションが複数存在していることが報告されている。それらは、それぞれ特異的第 1 エクソンとプロモータを持ち、翻訳開始点を含むエクソン(第 2 エクソン)以下を共通で持つ。さらに、卵巣型 *CYP19* は第 2 エクソンを転写開始点としており、第 1 エクソンを持たない。ツチガエルで既に単離されていた *CYP19* cDNA は卵巣由来のものであり、その転写開始点と翻訳開始点が同一のエクソンであったことから、このエクソンを第 2 エクソンとした。また、脳において *CYP19* cDNA の単離を試みたところ、卵巣型 *CYP19* よりも長い 5' 非翻訳領域が得られた。この領域を得られた *CYP19* 遺伝子断片において検索したところ、第 2 エクソンの上流 11.8 kbp の位置に存在することがわかったため、このエクソンを第 1 エクソンとした。本研究では卵巣型 *CYP19* の転写調節機構に注目しているため、第 2 エクソンの上流 17.8 kbp について、SF-1, FoxL2, Sox3 の DNA 認識配列を検索した。その結果、SF-1 結合サイトが 3 箇所、FoxL2 結合サイトが 4 箇所、Sox3 結合サイトが 4 箇所存在すると推定された。

第 4 章では、得られた *CYP19* プロモータの解析について、転写因子との相互作用を中心に述べている。*CYP19* の第 2 エクソンの上流-2730 bp をプロモータコンストラクトとして用い、SF-1, FoxL2, Sox3 の各転写因子の転写促進効果について検討した。その結果、SF-1 では転写促進が殆ど見られなかったのに対し、FoxL2 で 2.2 倍、Sox3 で 5.5 倍の促進が見られた。そこで特に促進効果の強かった Sox3 に注目し、*CYP19* プロモータの長さを変え転写量を調べた。その結果、プロモータの長さを-187 bp まで削除しても転写量が変わらないことが確認された。*CYP19* の第 2 エクソンの上流-187 bp までの間には、Sox3 結合サイトが-53 bp の位置に 1 箇所推定された。そこで、この領域を変異させたプロモータコンストラクトを作製して解析をしたところ、Sox3 による促進効果が消失した。さらに Sox3 について、その内部にある DNA 結合領域の HMG-box を欠失した変異タンパク質を合成する発現ベクターを構築し、同様に *CYP19* プロモータとの相互作用を調べたところ、促進効果が失われることが分かった。以上のことから、Sox3 はその HMG-box によって *CYP19* プロモータの-53 bp に存在する Sox3 結合サイトに結合し、*CYP19* の転写を促進することが示された。*Sox3* 遺伝子は性染色体上に存在することが分かっていたので、その塩基配列について比較検討するため、卵核性二倍体発生法により ZZ 胚・WW 胚を作製し、性染色体上の *Sox3* 遺伝子についてそれぞれ解析を行なった。その結果、タンパク質コード領域において、8 箇所の塩基配列の違いが確認されたが、そのいずれにおいてもアミノ酸の置換を引き起こすものではないことから、性染色体上のそれぞれの *Sox3* 遺伝子から発現する

Sox3 タンパク質には機能的な差が無いことが推測された。

第 5 章では、*CYP19* 遺伝子の転写調節における cAMP の影響について述べている。ヒトやマウスを用いた研究から、cAMP が *CYP19* の転写調節に重要な役割をしていることが既に報告されている。ツチガエル *CYP19* プロモータ上においても cAMP-response element (CRE) が 4 箇所推定されており、cAMP による *CYP19* の転写調節が推測された。そこで、*CYP19* プロモータ-2730 bp を用いてプロモーター解析を行なったところ、cAMP を培地に加えることでその転写活性が約 1.5 倍に上昇することが明らかになった。生殖腺における cAMP シグナル経路の上流には濾胞刺激ホルモン受容体(FSHR)及び黄体形成ホルモン受容体(LHR)の存在が予想されるので、それらの cDNA 配列の単離を試みた。この結果、*FSHR* では 1168 bp、*LHR* では 794 bp の cDNA 部分配列が得られ、それぞれ 389 残基、264 残基のアミノ酸配列が推定された。得られた配列をもとにそれぞれに特異的なプライマーを作製して発生過程の生殖腺における発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。その結果、*LHR* の発現に雌雄差が見られなかったが、*FSHR* は *CYP19*, *FoxL2*, *Sox3* と同様、生殖腺が形態的に分化する以前の st.25 から雌生殖腺において強い発現が見られた。このことから *FSHR* は cAMP 経路を介して *CYP19* 遺伝子の転写を調節している可能性が示唆された。

第 6 章では、本研究で得られた結果をもとに、卵巣分化過程における *CYP19* 遺伝子の転写調節機構について考察している。本研究において、*Sox3* は生殖腺の形態分化に先立って、*CYP19* と同様に雌生殖腺において強く発現することを明らかにした。加えてプロモータ解析において、*Sox3* は *CYP19* 遺伝子の転写を促進することを明らかにした。これらの結果から、*Sox3* は *CYP19* 遺伝子の発現を調節することで卵巣分化に重要な役割を持っている可能性を世界で初めて示した。また、この遺伝子は Z 及び W 性染色体上に存在しているので、Z 型及び W 型 *Sox3* 遺伝子について比較検討を試みた。この結果から、性染色体上の *Sox3* 遺伝子から発現する Sox3 タンパク質には機能差が無いことが推測された。今後、性染色体上の *Sox3* 遺伝子のプロモーターをそれぞれ単離し、その配列とプロモータ活性について検討していく必要がある。この他にプロモーター解析において、*FoxL2* で 2.2 倍、cAMP で 1.5 倍の *CYP19* 遺伝子の転写促進効果を確認した。また、発生過程における発現解析では *FoxL2*, *FSHR* とともに *CYP19* と同様に生殖腺の形態分化に先立って、雌生殖腺に強く発現することが示された。従って、*Sox3* だけでなく *FoxL2*, *FSHR* などの因子も関わって、*CYP19* 遺伝子の転写が調節されていることが推測された。今後、*FoxL2* 及び *FSHR* についてもそのプロモータを解析し、雌生殖腺において強く発現する機構について調べていく必要がある。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 大島 裕希 印

(2007年11月28日 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ (1)Expression of <i>Lhx9</i> isoforms in the developing gonads of <i>Rana rugosa</i>. Zoolog. Sci. 2007;Aug;24(8):798-802 <u>Oshima Y</u>, Noguchi K, and Nakamura M.</p> <p>(2)Expression of <i>DMRT</i> genes in the gonads of <i>Rana rugosa</i> during sex determination. Zoolog. Sci. 2007;Jan;24(1):95-9. Matsushita Y, <u>Oshima Y</u>, Nakamura M.</p> <p>○ (3)Promoter activity and chromosomal location of <i>Rana rugosa P450 aromatase (CYP19)</i> gene. Zoolog. Sci. 2006;Jan;23(1):79-85. <u>Oshima Y</u>, Kato T, Wang DS, Murakami T, Matsuda Y, Nagahama Y, and Nakamura M.</p> <p>(4)Molecular cloning and expression in gonad of <i>Rana rugosa WT1</i> and <i>Fgf9</i>. Zoolog. Sci. 2005;Sep;22(9):1045-50. Yamamura Y, Aoyama S, <u>Oshima Y</u>, Kato T, Osawa N, Nakamura M.</p> <p>(5)Molecular cloning of <i>Dmrt1</i> and its expression in the gonad of <i>Xenopus</i>. Zoolog. Sci. 2005;Jun;22(6):681-7. Osawa N, <u>Oshima Y</u>, Nakamura M.</p> <p>○ (6)<i>Wnt4</i> expression in the differentiating gonad of the frog <i>Rana rugosa</i>. Zoolog. Sci. 2005;Jun;22(6):689-93. <u>Oshima Y</u>, Hayashi T, Tokunaga S, Nakamura M.</p>

講演

(1)無尾両生類における FSHR 遺伝子の単離と発現解析
第 56 回日本動物学会関東支部会(東京) 2004 年 3 月
大島裕希, 中村正久

(2)アフリカツメガエルにおける FSHR 遺伝子及び LHR 遺伝子の単離と発現解析
第 75 回日本動物学会(神戸) 2004 年 9 月
大島裕希, 中村正久

(3)Promoter activity and chromosomal location of the *P450 aromatase (CYP19)* gene in the frog *Rana rugosa*.

FOURTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOLOGY OF VERTEBRATE SEX DETERMINATION
April 10-14, 2006, Kona, Hawaii, USA

Y. Oshima, T. Katou, D. Wang, T. Murakami, Y. Matsuda, Y. Nagahama, and M. Nakamura